

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : 2 740 656
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 96 01557

(51) Int Cl⁶ : A 01 H 5/00, C 12 N 5/14

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 08.02.96.

(30) Priorité : 02.11.95 NL 1001554.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 09.05.97 Bulletin 97/19.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : ENZA ZADEN DE ENKHUIZER
ZAADHANDEL BV SOCIETE DE DROIT
NEERLANDAIS — NL.

(72) Inventeur(s) : FABER NANNE MACHIEL, LAMBALK
JOHANNES JACOBUS MARIA, NOOTEBOS MARIA
GEERTRUIDA et ZAAL MONICA ANNA CLAZINA
MARIA.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : LERNER ET ASSOCIES.

(54) VEGETAL POSSEDANT LA STERILITE CYTOPLASMIQUE MALE DE LA FAMILLE COMPOSITAE ET
EGALEMENT PROCEDE D'OBTENTION DE CE VEGETAL.

(57) Végétal appartenant à la famille Compositae, dont le
cytoplasme est pourvu de mitochondries comprenant de
l'ADN qui a au moins partiellement pour origine une autre
espèce de la famille Compositae, et qui est le porteur de la
stérilité cytoplasmique mâle (CMS), par lequel le végétal a
été choisi dans le groupe constitué de *Cichorium intybus*
(L.) var. *Foliosum* (Hegi), *Lactuca sativa* (L.), *Cichorium en-*
divia (L.), *Scorzonera hispanica* (L.), *Cynara scolymus* (L.)
et *Taraxacum officinale* (L.).

FR 2 740 656 - A1

VEGETAL POSSEDANT LA STERILITE CYTOPLASMIQUE MALE DE LA
FAMILLE COMPOSITAE ET EGALEMENT PROCEDE D'OBTENTION DE
CE VEGETAL

5 L'invention concerne un végétal possédant la stérilité cytoplasmique mâle de la famille Compositae conforme à la revendication principale, c'est à dire, concerne de nouvelles lignées mères de ce végétal de ladite famille. L'invention concerne en outre un procédé d'obtention du végétal susmentionné possédant la stérilité cytoplasmique mâle, ainsi que la graine hybride obtenue des nouvelles lignées mères de la famille Compositae.

Dans le monde des phytogénéticiens il est habituel de combiner des propriétés héréditaires de deux lignées mères de l'hybride par
15 croisement. Si les deux lignées mères sont à pollinisation directe, la pollinisation directe est empêchée, par exemple par retrait des anthères (appelé émasculation), afin de garantir que les propriétés héréditaires désirées des deux parents sont présentes dans l'hybride. Cet hybride est également appelé hybride F1, et est d'une grande importance dans le
20 monde des phytogénéticiens. Les hybrides F1 sont habituellement caractérisés par un degré très élevé d'uniformité (couleur, goût, taille et similaires), une vigueur importante et un rendement élevé des parties végétales, telles que les fruits et similaires, qui peuvent être commercialisées. Un avantage supplémentaire d'un hybride F1 en
25 particulier pour les sociétés spécialisées en phytogénétique est surtout le fait qu'il n'est pas possible de cultiver des produits de la même qualité par la lignée provenant de la graine obtenue de celui-ci (hétérogénéité plus importante et rendement plus faible), de telle sorte que la société est garantie d'une protection inhérente de son hybride F1, tel qu'il était. Avec
30 les végétaux de la famille Compositae le développement de lignées mères et la production commerciale de graine hybride pure F1 est très

problématique, parce que ces végétaux sont en général à pollinisation directe et parce que les mesures d'anti-pollinisation directe qui ont été utilisées jusqu'à présent non seulement nécessitent beaucoup de temps et de travail, mais se sont surtout avérées être insuffisamment précises. En conséquence, ce dernier fait a pour résultat des lots de graines qui ne sont pas d'une qualité uniforme.

Par exemple, avec des choux (Brassica oleracea), il n'est actuellement pas possible de produire des hybrides F1 purs à 100% en utilisant des techniques modernes. Le fait est qu'avec le radis (Raphanus sativus), qui comme le chou appartient à la famille Cruciferae, il a été trouvé un cytoplasme entraînant la stérilité mâle, lequel cytoplasme est également connu sous le nom de cytoplasme Ogura à CMS. Les mitochondries du cytoplasme Ogura CMS sont introduites dans les végétaux Brassica oleracea par fusion des protoplastes, d'où il résulte que le noyau et les chloroplastes (granules de chlorophylle) proviennent tous de végétaux Brassica oleracea normalement fertiles. Ainsi les végétaux Brassica oleracea à CMS sont obtenus. Actuellement aucun hybride F1 de végétaux importants de la famille Compositae n'est encore disponible, malgré la forte demande sur le marché. Le cytoplasme Ogura à CMS susmentionné ne peut pas être utilisé avec des végétaux de la famille Compositae en raison de l'incompatibilité génétique entre les espèces desdites familles.

L'objet de l'invention est d'introduire la stérilité cytoplasmique mâle dans un végétal de la famille Compositae, et à cette fin le cytoplasme de ce végétal est pourvu de mitochondries comprenant de l'ADN qui a pour origine au moins partiellement une autre espèce de la famille Compositae et qui est porteur de stérilité cytoplasmique mâle (CMS). De manière surprenante les recherches ont montré que malgré la forte incompatibilité génétique des espèces végétales de la famille Compositae, l'introduction

de la CMS dans un végétal de la famille Compositae provenant d'un végétal d'une autre espèce de la même famille, par fusion des protoplastes, est très possible. De préférence le végétal est phénotypiquement un végétal possédant la stérilité cytoplasmique mâle, c'est à dire la stérilité mâle (généralement définie comme étant l'incapacité d'un végétal à produire des graines de pollen fertiles) s'est manifestée elle-même dans le végétal. En raison de l'hérédité cytoplasmique de la CMS toute la lignée de cette plante stérile mâle possède cette propriété inchangée. Il apparaîtra de manière évidente que la forme précédente d'une transmission héréditaire de la CMS génotypique est d'une grande importance pour le développement efficace de lignées mères des espèces végétales et pour la production subséquente d'hybrides F1. Il faut noter que le végétal ne doit pas nécessairement posséder phénotypiquement la stérilité cytoplasmique mâle, mais qu'il est également possible pour le noyau de posséder ce qu'on appelle des "gènes réparateurs", qui phénotypiquement annihilent la stérilité mâle, c'est à dire l'empêchent de se manifester elle-même dans le végétal malgré la présence d'ADN dans le cytoplasme, qui est un porteur de la CMS. Dans ce cas il sera nécessaire de maintenir le croisement jusqu'à ce qu'une plante possédant la CMS phénotypique soit obtenue.

Dans un premier mode de réalisation conforme à l'invention le cytoplasme du végétal comprend en outre un génome nucléaire et un génome chloroplastidial spécifiques de l'espèce qui sont normaux pour le végétal en question. En raison du fait qu'un noyau et des chloroplastes du végétal à fertilité normale sont présents à l'état non modifié (dans le cas du noyau c'est habituellement une situation de diploïdie), le produit est un produit pur à 100%.

30

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention l'autre espèce de la famille Compositae a été choisie dans le groupe constitué de *Helianthus* spp et *Circium* spp. Ces espèces se sont avérées contenir la CMS. Il a été choisi plus particulièrement *Helianthus annuus* (L.) (tournesol) avec la CMS du type pétiolaris. De manière surprenante l'introduction de la CMS à partir de ces plantes possédant génotypiquement la stérilité cytoplasmique mâle peut se faire d'une manière efficace par fusion des protoplastes, malgré l'incompatibilité génétique. A ce sujet il faut noter que la transmission de la CMS à partir des végétaux susmentionnés aux végétaux appartenant à la même famille ne peut pas être réalisée en utilisant des procédés classiques, en raison de barrières de croisement.

Conformément à l'invention l'autre espèce introduisant la CMS (le "donneur"), qui appartient à la famille Compositae, peut également être une espèce qui ne contient pas la CMS, mais qui introduit ce qu'on appelle une forme "alloplasmique" de la CMS dans le végétal par fusion des protoplastes. Conformément à l'invention une espèce de ce type est de préférence choisie dans le groupe constitué de Chrysanthemum, Senecio, Centaurea, Sonchus, Hieracium, Tagetes, Dahlia et Aster. De bons résultats ont été obtenus conformément à l'invention en particulier avec Chrysanthemum, plus particulièrement avec Sonchus.

Dans un autre mode de réalisation conforme à l'invention le végétal a été choisi dans le groupe constitué de Cichorium intybus (L.) var. foliosum (Hegi) (chicorée), Cichorium endivia (L.) (endive), Lactuca sativa (L.) (laitue), Scorzonera hispanica (L.) (salsifis noir), Cynara scolymus (L.) (artichaut) et Taraxacum officinale (L.) (pissenlit). Des expériences approfondies ont montré qu'en particulier Lactuca sativa, mais particulièrement Cichorium intybus (L.) var. foliosum et Cichorium endivia possèdent l'avantage important qu'il n'est perdu aucune autre propriété

qui n'est pas caractéristique du végétal à la suite de l'introduction de la CMS.

L'invention concerne en outre les graines ou parties végétales
5 provenant du végétal conforme à l'invention.

Les étapes générales du procédé d'obtention de végétaux, de
graines ou de parties végétales possédant la CMS et appartenant à la
famille Compositae conforme à l'invention comprennent:

- 10 - l'isolation de protoplastes (cellules végétales dont la membrane cellulaire a été retirée) de tissus de divers végétaux appartenant à la famille Compositae, ci-après appelé "accepteur", et de tissus d'une autre espèce de la famille Compositae, par exemple Helianthus species, ci-
15 après appelé "donneur" (voir l'exemple 1);
- le traitement facultatif des protoplastes, par exemple par irradiation, cytoplastisation ou par des produits chimiques spécifiques, qui en outre dans le procédé a pour résultat une augmentation du rendement (voir
exemple 2);
- 20 - la fusion des protoplastes (fusion in vitro de cellules), par exemple sous l'influence de substances chimiques, ou en utilisant l'électricité (voir exemple 3);
- la réalisation subséquente et facultative d'un ou de plusieurs procédés dont le résultat est une certaine forme de sélection de cellules hybrides;
25 cellules résultant de la fusion d'un ou de plusieurs protoplastes accepteurs avec un ou plusieurs protoplastes donneurs (voir exemple 4);
- la culture subséquente de cellules et leur régénération pour donner des végétaux complets (voir exemple 5);
- la sélection d'individus de la collection de régénérants ainsi obtenus par
30 analyse d'ADN mitochondrial, chloroplastidial et génomique, suivi de l'évaluation phénotypique des propriétés du végétal (voir exemple 6);

- le croisement spécifique des individus précédents, ou de leur lignée, avec d'autres génotypes de la même espèce et d'autres espèces (voir exemple 7);
- la production de graines à grande échelle.

5

L'invention sera expliquée plus en détail ci-après en se référant aux exemples (auxquels il a été déjà été fait référence brièvement ci-dessus) discutés ci-dessous, qui constituent tous les modes de réalisation préférés du procédé conforme à l'invention. Afin de ne pas compliquer ces exemples inutilement, les exemples sont fondés sur Helianthus annuus (L.) qui est le donneur. Comme cela a déjà été expliqué précédemment, l'invention concerne d'une manière générale un donneur de la famille Compositae d'une espèce autre que le végétal et n'est par conséquent pas limitée au donneur cité en référence dans les exemples.

15

Dans tous les exemples ci-dessous, les opérations doivent être réalisées de manière aseptique et toutes les solutions, milieux (dont les compositions seront décrites à une étape ultérieure) et instruments à utiliser doivent être stériles. Les boîtes de Pétri sont en outre scellées avec une couche pelliculaire, telle que Fuji, Nesco ou Parafilm.

Exemple 1:

Culture de matériau accepteur; feuille in vitro de chicorée, d'endive

25

et/ou de laitue

1. Laver les graines avec de l'éthanol à 70% pendant 10 secondes,

stériliser ensuite pendant 10 minutes dans du Na-hypochlorite à 1%, laver ensuite complètement avec de l'eau stérile. Ensemencer de manière aseptique dans un conteneur de culture tissulaire à usage unique avec environ 75ml de milieu MS (environ 8 grains/boîte). Cultiver à 25°C à la

lumière (16 heures d'éclaircment; environ 2000 lux/8 heures d'obscurité). Au bout de deux semaines environ les jeunes semis sont placés dans une boîte avec un milieu frais de MS (1 semis/boîte). Un mois après l'ensemencement les végétaux sont prêts à être utilisés comme matériau
5 de départ.

Isolation des protoplastes provenant de feuille de matériau accepteur; chicorée, endive et laitue

10 Couper le matériau en feuille in vitro ($\pm 25\text{cm}^2$) avec un scalpel dans une boîte de Pétri (TC, diamètre 9 cm) avec environ 10ml de PPO. Remplacer la solution après avoir coupé à raison de 10ml de solution de macération. Incubation: immobile, sombre, 25°C , environ 16 heures. Filtration à travers un tamis de nylon de $45\mu\text{m}$, lavage final et dilution de
15 la suspension avec environ 3 volumes de solution de lavage. Centrifuger la suspension de protoplastes dans des tubes à centrifugation de 15ml pendant 5mn à 600 tours par minute ($= 63 \times g$). Laver le dépôt deux fois avec 15ml de solution de lavage, centrifuger ensuite pendant 5mn à 600 tours par minute. Les protoplastes (pps) sont maintenant prêts pour la
20 fusion ou pour la culture, maintenant une étape d'inactivation, de préférence un traitement à l'acétate d'iode, peut être réalisée, si on le souhaite.

Culture du matériau donneur; hypocotyles de tournesol

25 Les hypocotyles étiolés sont choisis comme matériau de départ du donneur duquel les protoplastes sont isolés. En comparaison avec la feuille, qui est choisie comme tissu "accepteur", ce matériau végétal contient une quantité bien plus grande de mitochondries. De plus, les
30 hypocotyles ne contiennent aucun chloroplaste (ils contiennent certainement un certain nombre de proplastides), contrairement aux

cellules de la feuille. Cette sélection tissulaire conduit à une chance plus importante d'obtenir la composition correcte en organelles d'un produit de fusion. De plus cette sélection tissulaire permet la sélection optique à la suite de la fusion; les produits de fusion des protoplastes donneur et
5 accepteur sont reconnaissables.

Stériliser les graines de tournesol dans du Na-hypochlorite à 1% pendant 10mn, laver ensuite complètement avec de l'eau stérile. Ensemencer dans des boîtes de réplcation avec du milieu MS. Obscurité,
10 25°C.

Isolation des protoplastes du matériau donneur; tournesol

Couper la moitié supérieure des hypocotyles dans du PPO 15 au bout de 5 jours, couper les parties hypocotyles très finement dans une boîte de TC de 9cm avec 10ml de PPO, renouveler la solution de PPO après avoir coupé et laisser reposer pendant 1 heure, obscurité (température ambiante).

20 Remplacer la solution de PPO par une solution de macération. Incubation: immobile, obscurité, 25°C, 16 à 18 heures (coloration possible au FITC/FDA; 2 gouttes de solution mère saturée, dans de l'acétone, dans 10ml de solution de macération).

25 Filtration dans un tamis de nylon de 45µm, lavage final avec la solution de lavage. Centrifuger pendant 8 minutes à 600 tours par minute. Laver de nouveau le dépôt avec la solution de lavage; centrifuger pendant 8 minutes à 600 tours par minute. Les protoplastes (pps) sont maintenant prêts pour la fusion. Maintenant une étape
30 d'inactivation/élimination du noyau, par exemple irradiation ou cytoplastisation, peut être réalisée, si on le souhaite.

Les conditions de culture de la chicorée/endive ou de la laitue sont cependant telles que les chloroplastes de tournesol forment en fait des parties ou des cals, mais qu'il n'y a aucune régénération des pousses.

5. Exemple 2:

Inactivation du cytoplasme accepteur; traitement à l'acétamide d'iode

10. Tout comme l'acétate d'iode, l'acétamide d'iode est un inhibiteur biochimique orienté vers le cytoplasme. Il est utilisé ici pour inactiver les mitochondries des protoplastes accepteurs, en conséquence de quoi ces cellules peuvent à peine survivre, si tant est que ce soit possible. Cela donne aux mitochondries du donneur dans un produit de fusion un avantage sélectif sur celles de l'accepteur, tandis qu'en outre la croissance continue des produits de fusion est supportée de préférence à celle des protoplastes de l'accepteur en utilisant cette substance chimique. Le traitement des protoplastes avec l'acétamide d'iode se fera par exemple de la manière suivante:

25. Solution mère de 60mM, utiliser 1 à 5mM (de préférence 2,5mM) dans la solution de lavage avec une densité de cellules comprise entre 10^4 et 10^6 (de préférence 10^5), incubé pendant 5 à 30 minutes. (de préférence 15 minutes) à une température comprise entre 2 et 22°C, plus particulièrement à 4°C. Laver ensuite les protoplastes traités complètement avec la solution de lavage. Introduire ensuite les protoplastes dans la solution de fusion.

30. Inactivation du noyau donneur; irradiation

L'irradiation par rayons X, gamma ou ultraviolets a pour but la fragmentation de l'ADN chromosomique des protoplastes donneurs, en conséquence de quoi ces cellules ne peuvent plus se diviser. De plus, à la suite de cela le noyau du donneur dans un produit de fusion aura un inconvénient sélectif en comparaison avec l'accepteur. L'avantage de l'irradiation est que les membranes protoplastidiales ne sont pas trop endommagées, ce qui est important parce que la fusion peut y avoir un effet désastreux. L'inconvénient est, cependant, que le noyau reste présent, même à l'état fragmenté, avec en corollaire le risque d'une transmission au moins partielle d'ADN chromosomique du donneur à l'accepteur.

L'irradiation par rayons X se fera par exemple de la manière suivante: placer le pps à l'état suspendu dans un milieu de culture de pps à une densité d'environ $2,5 \times 10^6$ pps/ml dans une boîte de Pétri TC de 6cm (2ml) sous une source de rayons X (par exemple Baltobloc CE 100) à une distance appropriée, de telle sorte que la dose sera de 10krad par minute, pendant 3 à 20 minutes (de préférence 5 minutes). Laver ensuite les cellules deux fois avec la solution de lavage.

20

L'irradiation gamma se fait habituellement au moyen d'une source de Cobalt 60. De même ici les protoplastes sont introduits dans du milieu de culture de pps. Une dose appropriée est de 2 à 30 krad. Suivi d'un lavage deux fois dans une solution de lavage.

25

Elimination du noyau du donneur; cytoplastisation

Lors de la cytoplastisation le noyau est retiré du protoplaste, de telle sorte que la seule chose qui reste est un cytoplaste qui contient des mitochondries et des protoplastides. Il y a plusieurs moyens pour réaliser cela. Par exemple, la différence de masse spécifique entre le noyau et le

30

cytoplast peut être utilisée. Le noyau est littéralement chassé de la cellule par centrifugation à haute vitesse et un gradient discontinu (percolle/sucrose), avec possibilité de la présence de cytochalacine-B. Un procédé différent plus doux est d'effectuer une forte plasmolyse pendant l'incubation enzymatique, en utilisant une solution de macération ayant une osmolarité relativement élevée (par exemple 0,7M de Mannitol), dans cet état les cytoplastes sont formés spontanément; jusqu'à 40% des cellules. Ces cytoplastes peuvent ensuite être séparés des protoplastes en utilisant la différence de masse spécifique entre protoplastes et cytoplastes. Le mélange pps/cps est chargé sur un gradient percolle/mannitol et réfractionné par centrifugation à vitesse faible (160 x g; 10 minutes). Le succès de ces opérations dépend dans une large mesure de la sélection du matériau de départ. Une combinaison des procédés décrits précédemment est possible, si nécessaire. Bien sûr les cytoplastes sont lavés (solution de lavage) après purification, et sont introduits dans la solution de fusion. Un avantage essentiel des cytoplastes est que le noyau est éliminé, ce qui élimine la possibilité de transmission d'ADN chromosomique du donneur à l'accepteur. Un inconvénient de la fusion PEG est que les cytoplastes ont une masse spécifique faible, en conséquence de quoi ils suragent.

Exemple 3:

La fusion PEG des protoplastes mésophyles de chicorée/endive/laitue avec des protoplastes d'hypotocyles de tournesol

Donner aux gouttes de 100µl (1 ou 2 pour la chicorée, 4 à 8 pour l'endive et la laitue) d'une suspension de pps une densité de 10^6 , d'où il résulte que les partenaires de la fusion sont mélangés à raison de 1:1, pour rester non perturbés dans une solution de fusion dans des boîtes de

Pétri non recouvert s (9cm de diamètre pour la chicorée, 6cm pour l'endive et la laitue) pendant 15 minutes. Pour chaque goutte de solution de pps deux petites gouttes (environ 20µl) de PEG1 sont chargées; au bout de 2 à 10 minutes, en fonction de la fragilité des pps (le plus souvent 4 minutes), la boîte est maintenue dans une position inclinée et le liquide peut être aspiré au niveau du bord au moyen d'une pipette pasteur, tandis que les protoplastes restent collés au fond où ils se sont établis. Quelques gouttes de PEG2 sont soigneusement chargées et au bout de 3 à 15 minutes (le plus souvent 7 minutes) elles sont retirées de la même manière que la solution de PEG1. Faire la même chose pour PEG3, ajouter et retirer au bout de 5 à 30 minutes (le plus souvent 10 minutes). Remplir ensuite de nouveau avec le milieu de culture de protoplastes (10ml de milieu WA pour la chicorée, 2ml de milieu AA pour l'endive ou 2ml de milieu SA pour la laitue) et cultiver de la manière décrite précédemment. La fusion de PEG est un procédé très approprié pour fusionner de grandes quantités de protoplastes en une seule fois.

Electrofusion de protoplastes mésophyles de chicorée/endive/laitue avec des protoplastes hypotocyles de tournesol

20

L'électrofusion doit être préférée à la fusion PEG lorsque les protoplastes des deux parents de la fusion ont par exemple des masses spécifiques assez différentes. C'est, par exemple, le cas lorsque les cytoplastes (voir l'exemple 2 précédent) sont utilisés comme matériau donneur; en conséquence de l'absence de noyau les cellules sont d'un poids relativement faible, ce qui les fait flotter, cela rend la fusion PEG impossible. Un avantage est que le processus d'électrofusion rend possible un travail de grande précision et avec grande maîtrise; même la fusion de seulement deux protoplastes est possible. Pour cela un appareil destiné à l'électrofusion et une chambre de fusion sont nécessaires. La procédure peut être la suivante:

30

le mélange de protoplastes donneurs et accepteurs est suspendu dans une solution isotonique (0,5M de Mannitol + 0,2mM de CaCl_2), et est chargé dans la chambre de fusion.

5

Ensuite un champ électrique généré par un courant alternatif à haute fréquence (oscillation comprise entre 0,3 et 1,5MHz) est appliqué, ce qui fait que les protoplastes se disposent eux-mêmes en chaînes; durée (10 secondes à 10 minutes). La densité de pps (10^4 à 2×10^6) et l'intensité du champ (1 à 150V RMS/cm) déterminent la longueur des chaînes et doivent constamment être optimisés. Ensuite les protoplastes sont exposés à une ou plusieurs pointes de courant fortes et courtes, ce qui peut provoquer la fusion des membranes qui sont en contact entre elles. L'amplitude de l'impulsion ou des impulsions (40 à 3000 V/cm) ainsi que la durée (10 microsecondes à 1 milliseconde), la forme (bloc), le nombre (1 à 10) et la largeur de l'impulsion ou des impulsions ont une influence sur la fréquence de fusion et la survie des cellules. Le champ généré par le courant alternatif sera maintenu pendant un certain temps, après quoi les cellules peuvent être introduites dans le milieu de culture pps.

20

Exemple 4:

Tri des cellules

25

Il est possible de séparer les produits de fusion désirés, de préférence 5 à 10% du nombre total de protoplastes, du mélange de fusion par purification directement après la fusion. Il va sans dire que cela profitera au rendement de la procédure totale. Pour cela des techniques qui sont connues en soi peuvent être utilisées, telles que la micromanipulation, le tri par écoulement ou d'autres techniques. Il n'est,

30

cependant, pas nécessaire d'utiliser le tri de cellules, en particulier si l'inactivation (par exemple à l'acétamide d'iode), l'irradiation et/ou les cytoplastes sont utilisés. De plus, les tournesols ne seront pas régénérés dans les conditions décrites pour la chicorée, l'endive ou la laitue.

5

Exemple 5

Culture des protoplastes de chicorée

10 Ensemencer dans du milieu WA, la densité étant de 5×10^3 pps/ml, 10ml dans une boîte de Pétri TC de 9cm.

Culture à 25°C, dans l'obscurité.

15 La dilution avec le milieu WB se fait en 10 jours après isolation, afin d'empêcher le brunissement et la coloration des cellules. Diluer à 1/10 dans des boîtes de Pétri TC de 9cm (10ml par boîtes). Maintenir les boîtes de nouveau à 25°C, mais maintenant en lumière tamisée (16 heures à la lumière; environ 500 lux / 8 heures dans l'obscurité).

20

Lorsque les cals ont un diamètre raisonnable (à partir de 2mm), environ 1 à 2 mois après l'isolation des protoplastes, ils doivent être transférés dans un milieu de régénération des pousses; milieu WC, environ 50 cals par boîte de Pétri (diamètre 9cm) avec environ 20ml de milieu. 25°C, à la lumière (16 heures à la lumière; environ 1000 lux / 8 heures dans l'obscurité).

25

Au bout d'un mois environ des pousses peuvent être coupées des cals et être transférées vers des conteneurs de culture tissulaire à usage unique (6 à 8 par boîte) avec environ 75ml de milieu D pour le

30

développement des racines, à la lumière (16 heures à la lumière; environ 1000 lux / 8 heures dans l'obscurité) à 25°C.

Culture des protoplastes d'endive

5

Ensemencer dans du milieu AA, densité de 10^4 à 10^5 pps/ml, 2ml dans une boîte de Pétri TC de 6cm.

Culture à 25°C, dans l'obscurité.

10

Lorsqu'il y a une division et qu'au moins une partie des protoplastes a atteint une étape de 4 cellules, il faut réaliser la dilution avec du milieu WB, par exemple 1/2. Maintenir les boîtes de nouveau à 25°C, mais maintenant à la lumière tamisée (16 heures à la lumière; environ 500 lux / 8 heures dans l'obscurité).

15

Lorsque les cals ont un diamètre raisonnable (à partir de 2mm) environ 2 à 4 mois après l'isolation des protoplastes, ils doivent être transférés au milieu de régénération des pousses; AC, environ 50 cals par boîte de Pétri (diamètre 9cm) avec environ 20ml de milieu. 25°C, à la lumière (16 heures d'éclairement; environ 1000 lux / 8 heures dans l'obscurité).

20

Au bout de 2 à 4 mois des pousses peuvent être coupées des cals et être transférées aux conteneurs de culture tissulaire à usage unique (6 à 8 par boîte) avec environ 75ml de milieu D pour le développement des racines, à la lumière (16 heures d'éclairement; environ 1000 lux / 8 heures dans l'obscurité) à 25°C.

25

Culture des protoplastes d'ail

30

Ensemencer dans du milieu SA, densité $2,5 \times 10^4$ pps/ml, 2ml dans une boîte de Pétri TC de 6cm.

Culture à 25°C, dans l'obscurité.

5

Une semaine après l'isolation des pps la première dilution avec du milieu SB se fera, par exemple dans un rapport de 1:1 et ensuite tous les 5 jours, afin d'empêcher le brunissement et la coloration des cellules.

10

Lorsque les cals ont un diamètre raisonnable (à partir de 2mm), environ 1 mois après l'isolation des protoplastes, ils doivent être transférés au milieu de régénération des pousses, milieu SC, environ 50 cals par boîte de Pétri (diamètre 9cm) avec environ 20ml de milieu. 25°C, à la lumière (16 heures d'éclairement; environ 1000 lux / 8 heures dans l'obscurité).

15

Au bout de deux mois des pousses peuvent être coupées des cals et être transférées aux conteneurs de culture tissulaire à usage unique (6 à 8 par boîte) avec environ 75ml de milieu D pour le développement des racines, à la lumière (16 heures d'éclairement; environ 1000 lux / 8 heures dans l'obscurité) 25°C.

Exemple 6:

25

Analyse de l'ADN mitochondrial et chloroplastidial

30

L'ADN total est isolé du matériel de feuille des produits donneurs, accepteurs, de fusion et de la lignée au moyen du procédé Dellaporte (Plant Molecular Biology reporter, vol. 1, numéro 4 (1983)). L'ADN total comprend l'ADN génomique, mitochondrial et chloroplastidial. L'ADN total est digéré en fragments plus petits par des enzymes de restriction. L'ADN

digéré est ensuite séparé selon la taille des fragments par électrophorèse dans un gel d'agarose. Après séparation, des fragments d'ADN monobrin sont transférés vers une membrane chargée positivement par blotting sous vide, ce qu'on appelle le "principe Southern blotting" (Journal Mol. Biol. 98, 503-517 (1975)). Les diverses membranes comprenant les produits d'ADN monobrin sont hybridées avec:

- des séquences d'ADN mitochondrial, codes: pEZMT22 et pEZMTA2;
- la séquence d'ADN chloroplastidial, code: pEZCP64.

10

Pour le marquage, l'hybridation et la détection il est utilisé le "système de détection et de marquage directs des acides nucléiques ECL n°RPN3001" (Amersham).

15

Toute modification de l'ADN mitochondrial des régénérants qui est détectée peut d'un côté être attribuée à l'apparition de réarrangements spécifiques pendant les procédures de fusion et de régénération qui ont suivi. Le produit de fusion et la lignée peuvent contenir de la même manière, au moins partiellement, l'ADN mitochondrial du donneur. La figure 1 présente un produit de fusion spécifique et la lignée de celui-ci contenant l'ADN mitochondrial, qui est le résultat des événements de recombinaison spécifique entre l'ADN mitochondrial du donneur (Helianthus) et celui de l'accepteur (Cichorium).

20

Figure 1:

Hybridation avec pEZMTA2, enzyme de restriction *bgIII*. La figure représente *Helianthus* (le donneur), *Cichorium* (l'accepteur) et divers produits de fusion (A à J). La figure montre clairement que les bandes spécifiques *Helianthus* sont présentes dans un certain nombre de produits de fusion (phénotype *Cichorium*). En raison des procédures qui ont été suivies les génomes mitochondriaux du donneur et de l'accepteur ont fusionnés.

Figure 2 :

- 10 Hybridation avec pEZMT22, enzyme de restriction *EcoRI*. La figure représente *Helianthus* (le donneur), *Cichorium* (l'accepteur) et 1 produit de fusion à CMS. La figure montre également 5 plantes qui sont des rétrocroisements des produits de fusion (la mère) et le *Cichorium*/accepteur (le pollinisateur). Du profil de l'ADN mitochondrial
- 15 du produit de fusion et de la lignée (rétrocroisements) il apparaît que l'ADN mitochondrial a changé. L'ADN mitochondrial ainsi modifié est transmis de manière stable à la lignée

Figure 3:

- Hybridation avec pEZCP64, enzyme de restriction *DraI*. La figure montre
- 20 que le produit de fusion à CMS et sa lignée contiennent le type de chloroplaste de l'accepteur (*Cichorium*).

Figure 4:

- La détermination de la ploïdie des produits de fusion tournesol-chicorée (CMS). Cela se fait au moyen de mesures relatives de la quantité d'ADN
- 25 nucléaire par cytométrie par écoulement (Ulrich & Ulrich, Protoplasm, 1991, 165: 212-215). Les mesures relatives à la chicorée, au tournesol et à un produit de fusion à CMS de la chicorée. Cette comparaison montre clairement que le produit de fusion n'est pas différent de la chicorée en ce qui concerne le niveau de ploïdie.

Figure 5:

Fleur de chicorée à fertilité normale, avec les anthères et le pollen clairement discernable.

Figure 6:

- 5 Fleur de chicorée à stérilité cytoplasmique mâle, montrant clairement que les anthères ne sont pas développées et qu'aucun pollen n'est formé, alors que le reste de la fleur est normal.

Figure 7:

- Détail de deux fleurs rayonnantes de chicorée (montrant une fleur à fertilité normale sur la gauche et une fleur à stérilité cytoplasmique mâle sur la droite), les anthères et le pollen étant présents dans la fleur fertile et manquant dans la fleur stérile.
- 10

Ex mple 7:**Croisements**

- 5 Il est naturellement nécessaire de multiplier les produits de fusion et d'adapter le génotype aux dernières exigences de nouveau au moyen de procédés courants des phytogénéticiens. La graine doit être produite à cette fin. Cela peut se faire à grande échelle dans des cages en utilisant des abeilles ou des mouches, ou tout particulièrement par croisement
- 10 manuel. Dans ce cas les pollens d'un pollinisateur approprié sont placés sur les pistils du produit de fusion (ou de sa lignée), après quoi les graines sont formées. En conséquence de l'hérédité maternelle toutes les propriétés codées par le cytoplasme, telles que la CMS, seront présentes dans toute la lignée. De cette manière il est possible de réaliser des
- 15 combinaisons à la fois inter-spécifiques et intra-spécifiques. Un bon exemple de croisement simple intra-spécifique est la combinaison de chicorée et d'endive; aucune technique spéciale, telle que le sauvetage de l'embryon, n'est nécessaire pour réaliser ce croisement.

20 Milieux et solutions

PPO (solution-préplasmolyse)

54,64 g/l de sorbitol

7,35 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

25 0,59 g/l de MES

pH 5,8, autoclave (20 minutes, 115°C)

Solution de macération

30 Dissoudre des enzymes dans du milieu WA

Cellulase R-10 0,0667%

Driselase	0,033%
Macérogel R-10	0,013%
Cellulysin	0,2%
Macérase	0,03%
MES	0,2 g/l
2,4D	0,33 mg/l
BAP	0,16mg/l
pH 5,6	filtre stérile (0,22µM)

Solution de lavage

CaCl₂.2H₂O	0,2%
Kcl	2,5%
MES	0,06%
pH	5,8 autoclave

5 Solution de fusion

Sorbitol	0,15M
CaCl₂.2H₂O	0,03M
KCl	0,075M
Tris-HCl	0,05M
pH	7,2 autoclave

PEG1

PEG1500	40%
Glucose	0,3M
CaCl₂.2H₂O	50mM
Stérilisation du filtre	(0,22µM)

PEG2

PEG1500	13,3%
Glucose	0,1M
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,067M
Sorbitol	0,067M
Stérilisation du filtre	(0,22µM)

PEG3

PEG1500	6,7%
Glucose	0,05M
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,083M
Sorbitol	0,083M
Stérilisation du filtre	(0,22µM)

Abréviations utilisées

PEG	polyéthylène glycol
NAA	acide α-naphtalène acétique
2,4D	acide 2,4dichlorophénoxy acétique
BAP	6-benzyl amino purine
IAA	acide indole-3-acétique
IBA	acide indole-3-butyrique
MES	acide (2(N-morpholino)éthanesulfonique
FITC	isothio cyanate de fluorescéine
FDA	diacétate de fluorescéine
TC	culture tissulaire

Composition des milieux (mg/l)

	MS	AA	WA	WB	WC	D	SA	SB	SC	AC
KNO ₃	1900	1900	-	-	1900	950	1900	1900	1900	1900
NH ₄ NO ₃	1650	600	-	-	1650	825	80	80	80	80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	300	123	123	370	185	370	370	370	370
KH ₂ PO ₄	170	170	68	68	170	85	170	170	170	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	600	440	440	440	220	440	440	440	440
KCl	-	300	750	750	-	-	-	-	-	-
KI	0,83	0,75	0,75	0,75	0,83	0,42	0,83	0,83	0,83	0,83
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	10	10	10	22,3	11,15	22,3	22,3	22,3	22,3
H ₃ BO ₃	6,2	3	3	3	6,2	3,1	6,2	6,2	6,2	6,2
ZnSO ₄ ·2H ₂ O	8,6	2	2	2	8,6	4,3	8,6	8,6	8,6	8,6
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,013	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,013	0,025	0,025	0,025	0,025
Fe-EDTA	43	43	43	43	43	21,5	43	43	43	43
Thiamine-HCL	0,1	10	10	10	0,1	0,05	0,5	0,5	0,5	0,5
pyridoxine-HCl	0,5	1	1	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide nicotinique	0,5	1	1	1	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5
Acide ascorbique	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-
Pyruvate de sodium	-	20	20	20	-	-	-	-	-	-
Acide citrique	-	40	40	40	-	-	-	-	-	-
Acide malique	-	40	40	40	-	-	-	-	-	-
Acide fumarique	-	40	40	40	-	-	-	-	-	-
Glycine	2	-	-	-	2	1	2	2	2	2
Fructose	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	250	80000	80000	-	-	91000	-	-	-
Inositol	100	100	100	100	100	50	100	100	100	100
Sucrose	10000	250	20000	20000	10000	10000	10000	10000	20000	10000
Glucose	-	68400	-	-	-	-	-	-	-	-
Acide casamino	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-
Lait de coco mM	-	20	-	-	-	-	-	-	-	-
AGAR	8000	-	-	-	8000	8000	-	-	8000	8000
TWEEN-20	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-
Glutamine	-	-	750	750	-	-	-	-	-	-
Amidon soluble	-	-	-	-	-	10000	-	-	-	-
NAA	-	0,1	-	0,1	-	-	0,1	0,5	0,5	-
2,4-D	-	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
IAA	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-
Zéatine	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-	-

BAP	-	0,1	-	1,0	0,5	-	0,5	0,5	1,0	0,1
IBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
pH	5,7	5,6	5,8	5,8	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,8

N.B. Milieu autoclave avec AGAR: 20 minutes, 115°C

Milieu de stérilisation du filtre sans AGAR/ 0,22µM

REVENDEICATIONS

1. Végétal appartenant à la famille Composita, dont le cytoplasme est pourvu de mitochondries comprenant de l'ADN qui a au moins
5 partiellement pour origine une autre espèce de la famille Compositae, et qui est le porteur de la stérilité cytoplasmique mâle (CMS).
2. Végétal selon la revendication 1, dont les cellules comprennent un
10 génome nucléaire et un génome chloroplastidial spécifiques de l'espèce qui sont normaux pour le végétal en question.
3. Végétal selon la revendication 1 ou 2, où ledit végétal possède
phénotypiquement la stérilité cytoplasmique mâle.
- 15 4. Végétal selon la revendication 1, 2 ou 3, où l'autre espèce de la famille Compositae a été choisi dans le groupe constitué de Helianthus spp. et Cirsium spp.
5. Végétal selon la revendication 4, où l'autre espèce de la famille
20 Compositae est Helianthus annuus (L.) avec CMS du type petiolaris.
6. Végétal selon la revendication 1, 2 ou 3, où l'autre espèce de la famille Compositae a été choisi dans le groupe constitué de Chrysanthemum, Senecio, Centaurea, Sonchus, Hiéracium, Tagetes,
25 Dahlia et Aster.
7. Végétal selon l'une quelconque des revendications précédentes 1 à 6, où le végétal a été choisi dans le groupe constitué de Cichorium intybus (L.) var. Foliosum (Hegi), Cichorium endivia (L.), Lactuca sativa (L.),
30 Scorzonera hispanica (L.), Cynara scolymus (L.) et Taraxacum officinale (L.).

8. Graines ou parties végétales provenant d'un végétal conforme à l'une quelconque des revendications précédentes.

5 9. Procédé de préparation d'un végétal selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il consiste à :

- isoler des protoplastes de tissus de divers végétaux appartenant à la famille Compositae, dits "accepteurs" et de tissus d'une autre espèce de la famille Compositae, dits "donneurs";

10 - traiter éventuellement des protoplastes, notamment par irradiation, cytoplastisation ou par des produits chimiques spécifiques ;

- fusionner des protoplastes, notamment sous l'influence de substances chimiques ou en utilisant l'électricité ;

- sélectionner éventuellement certaines cellules hybrides ;

15 - cultiver ensuite les cellules et les régénérer pour donner des végétaux complets ;

- sélectionner des individus de la collection de régénérants ainsi obtenus par analyse d'ADN mitochondrial, chloroplastidial et génomique,

suivi de l'évaluation phénotypique des propriétés du végétal ;

20 - croiser spécifiquement des individus précédents ou de leur lignée avec d'autres génotypes de la même espèce et d'autres espèces ;

- produire des graines à grande échelle.

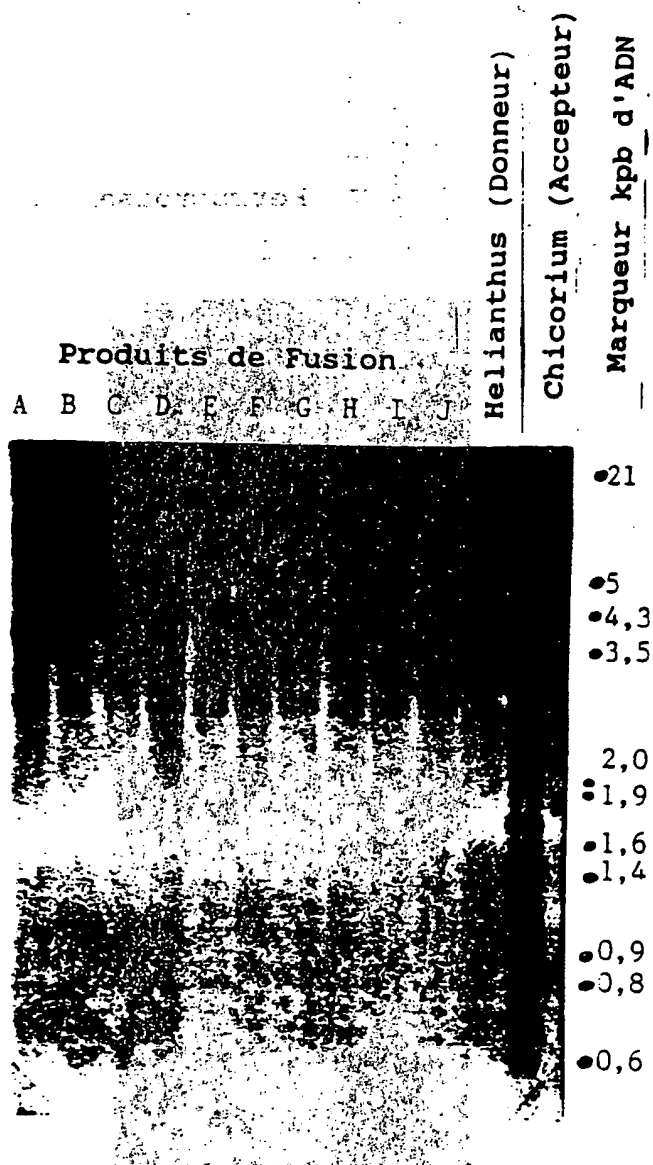


FIG 1

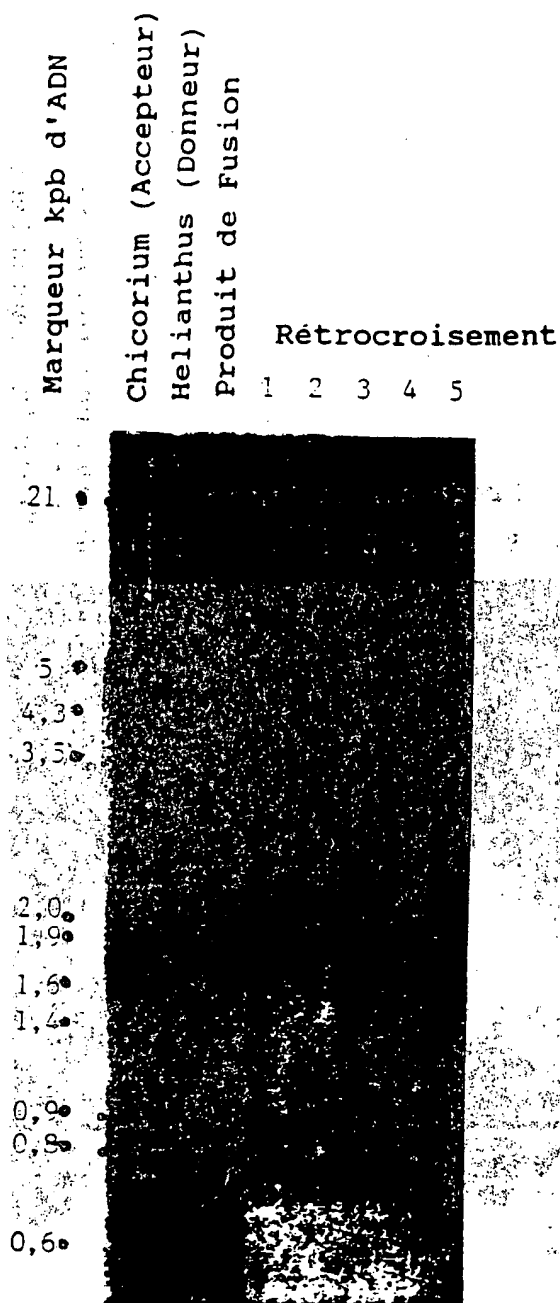


FIG 2

Chicorium (Accepteur)
Helianthus (Donneur)
Produit de fusion

Rétrocroisement

1 2 3 4 5

Marqueur kpb d'ADN

• 21

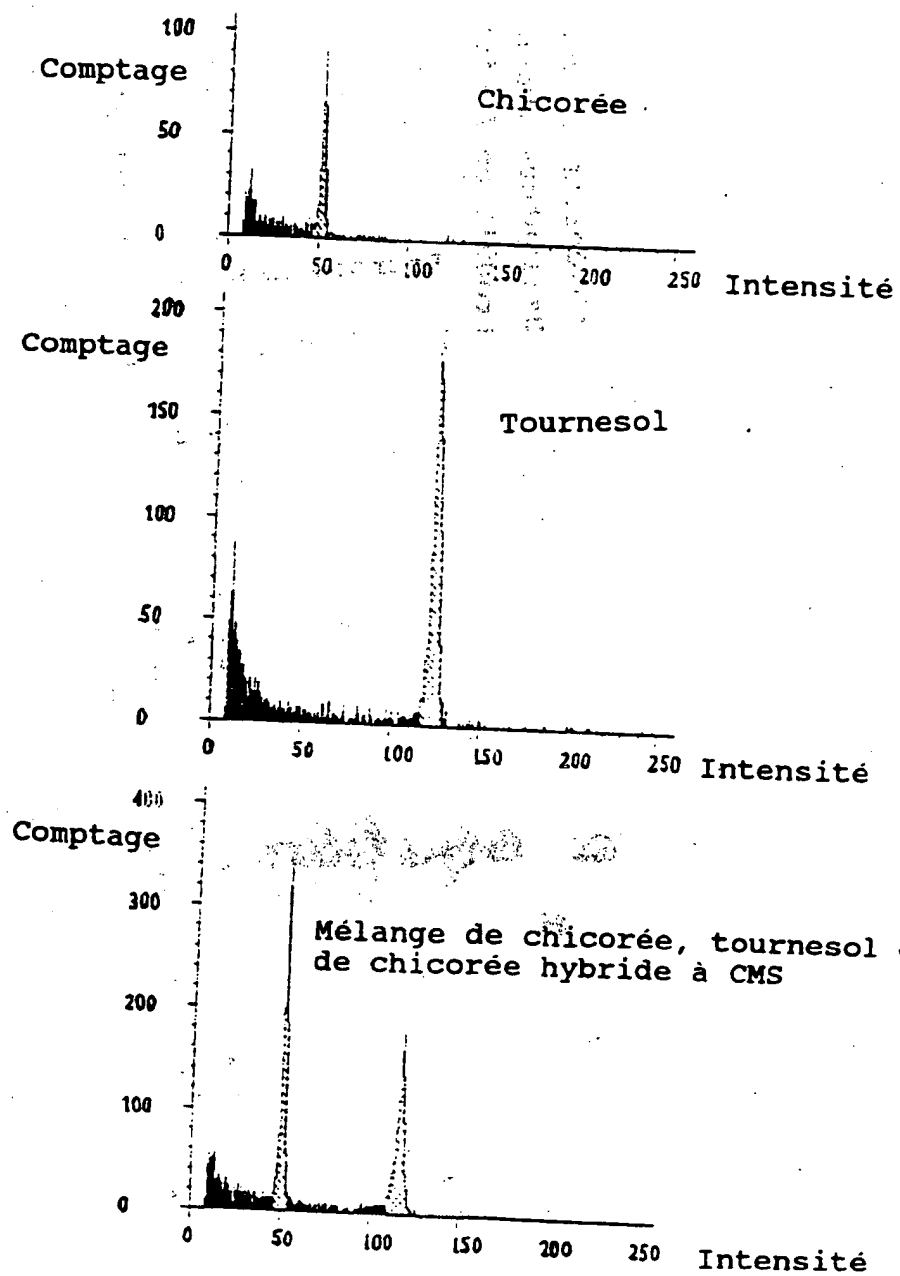
• 5
• 4,3
• 3,5

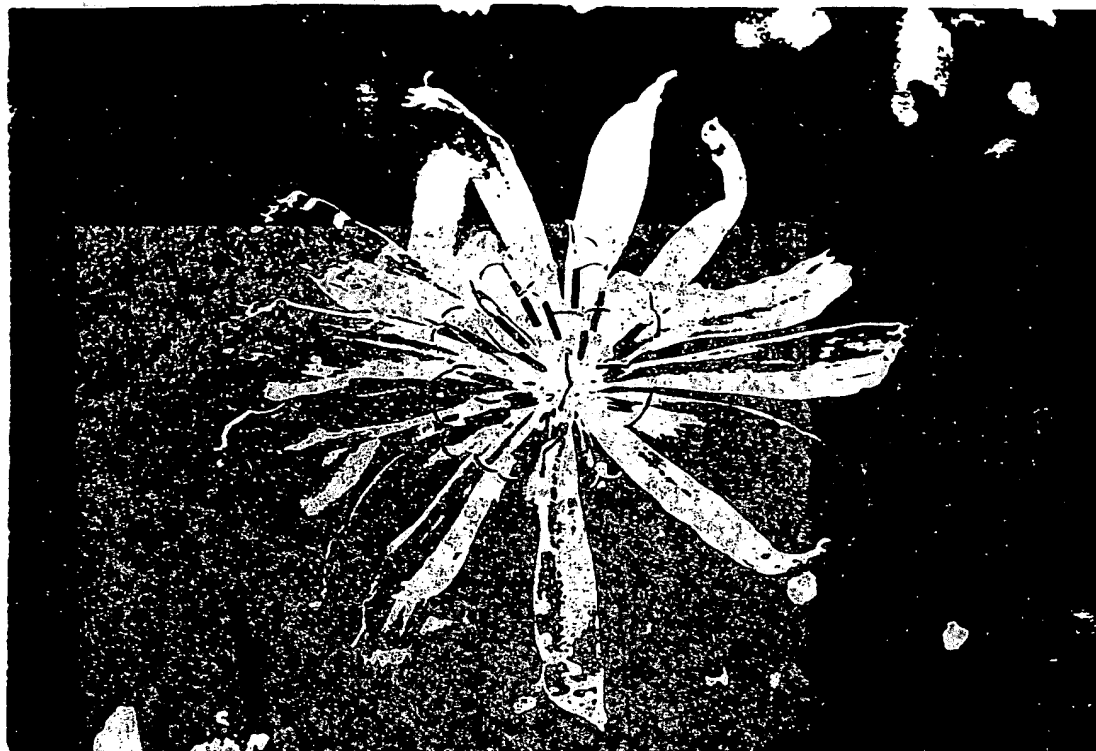
• 2,0
• 1,9
• 1,6
• 1,4

• 0,9
• 0,8

• 0,6

FIG 3

**FIG 4**

**FIG 5****FIG 6**

**FIG 7**

